

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2005 年 9 月 9 日 (09.09.2005)

PCT

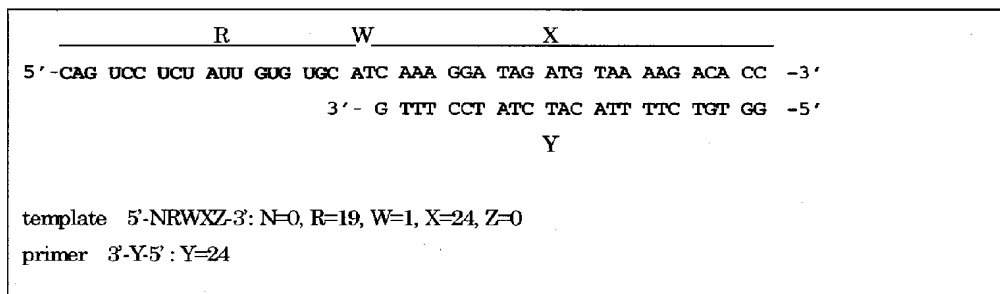
(10) 国際公開番号
WO 2005/083112 A1

- (51) 国際特許分類: C12Q 1/48, C12N 15/09, C12Q 1/68, G01N 33/15, 33/50
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/003100
- (22) 国際出願日: 2005 年 2 月 25 日 (25.02.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-052627 2004 年 2 月 27 日 (27.02.2004) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 塩野義製薬株式会社 (SHIONOGI & CO., LTD.) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 3 丁目 1 番 8 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉永 智一 (YOSHINAGA, Tomokazu) [JP/JP]; 〒5660022 大阪府摂津市三島 2 丁目 5 番 1 号 塩野義製薬株式会社内 Osaka (JP). 矢野 貴雄 (SHISHIDO, Takao) [JP/JP]; 〒5660022 大阪府摂津市三島 2 丁目 5 番 1 号 塩野義製薬株式会社内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 山内 秀晃, 外(YAMAUCHI, Hideaki et al.); 〒5530002 大阪府大阪市福島区鷺洲 5 丁目 1 番 4 号 塩野義製薬株式会社 知的財産部 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR SCREENING H-TYPE RNASE INHIBITOR OF REVERSE TRANSCRIPTASE

(54) 発明の名称: 逆転写酵素の H 型 RNA 分解酵素阻害剤のスクリーニング方法



(57) Abstract: A test compound can be preincubated against a reverse transcriptase-substrate complex formed in the presence of a metal ion by using: a template 5' -NRWXZ-3' and a primer 3' -Y-5' ; wherein Y is hybridizable with X in the template; N represents a 13- to 19-mer DNA, RNA or chimeric nucleic acid; R represents an RNA; W represents a DNA or a chimeric nucleic acid; X represents a 15-mer or higher DNA, RNA or chimeric nucleic acid; Y represents a DNA, an RNA or a chimeric nucleic acid having the same length as X to be hybridized therewith, provided that Y is a DNA in the case where X to be hybridized therewith is a DNA, Y is an RNA in the case where X to be hybridized therewith is an RNA, or Y is a chimeric nucleic acid in the case where X to be hybridized therewith is a chimeric nucleic acid (in the chimeric nucleic acid, Y is a DNA in the case where X is a DNA, or Y is an RNA in the case where X is an RNA); and Z represents a DNA, an RNA or a chimeric nucleic acid, provided that W and Z may be nil; and thus a method for screening a substance inhibiting polymerase-dependent RNase H activity is established.

(57) 要約: テンプレート: 5' -NRWXZ-3' プライマー: 3' -Y-5' (YはテンプレートのXにハイブリダイズし、Nは13~19merのDNA、RNA又はキメラ核酸、RはRNA、WはDNA又はキメラ核酸、Xは15mer以上のDNA、RNA又はキメラ核酸、YはハイブリダイズするXと同じ長さのDNA、RNA又はキメラ核酸であり、ハイブリダイズするXがDNAの場合はDNA、ハイブリダイズするXがRNAの場合はRNA、ハイブリダイズするXがキメラ核酸の場合はキメラ核酸(キメラ核酸中、XがDNAの場合はDNA、XがRNAの場合はRNAである)、ZはDNA、RNA又はキメラ核酸(但し、WとZは無くてもよい)である)を用いることにより、金属イオン存在下で形成される逆転写酵素-基質複合体に対して被検化合物をブレインキューベーションすることを可能とし、ポリメラーゼ依存的RNase H活性を阻害する物質のスクリーニング方法を確立した。

WO 2005/083112 A1



SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

逆転写酵素のH型RNA分解酵素阻害剤のスクリーニング方法

技術分野

- [0001] 本発明は、逆転写酵素の活性を阻害する化合物の探索手段に関する。より詳しくは、逆転写酵素のH型RNA分解酵素(RNase H)阻害剤のスクリーニング方法に関する。

背景技術

- [0002] エイズ(AIDS)は現在でも人類の主な死因である。この病原体であるレトロウイルスは、逆転写酵素、インテグラーゼ及びプロテアーゼの3つのウイルス特異的酵素を利用して宿主細胞内で増殖する。そのため、従来、レトロウイルスが原因とされる病気の予防剤及び治療剤を開発する目的で、ウイルスの特異的酵素の活性を阻害する化合物の探索が求められてきた。
- [0003] レトロウイルスの特異的酵素の1つである逆転写酵素は、核酸結合部位において二重鎖の核酸と結合し、RNAをテンプレートとしてDNAを合成することができるという点に特徴のある酵素として知られており、ポリメラーゼ活性とRNase H活性という2つの酵素活性を持つ。ポリメラーゼの活性中心とRNase Hの活性中心間の距離は約18ヌクレオチドであるが、核酸の配列によって約14〜20ヌクレオチドと多様であると推定されている(非特許文献1参照)。ポリメラーゼ活性ドメインとRNase H活性ドメインのそれぞれのドメインに2価の金属イオンが結合すると活性が発現し、ポリメラーゼ活性部位においてRNAテンプレートが逆転写され、RNase H活性部位においてRNA:DNAヘテロ二重鎖のRNAが加水分解により切断される。
- [0004] 逆転写酵素のポリメラーゼ活性はDNA合成を行う反応であり、DNA合成反応開始にテンプレート及びプライマーを必要とするが、該テンプレート及びプライマーはRNAでもDNAでも使用することが可能である。また、RNase H活性には、(i)ポリメラーゼによるDNA合成に伴ってテンプレートのRNAを切断するという、ポリメラーゼ依存的RNase H活性と、(ii)ポリメラーゼによるDNA合成を伴わず、逆転写酵素が二重鎖の核酸と結合した際にRNase H活性部位にRNA:DNAヘテロ二重鎖が存在するとRNA

を切断するという、ポリメラーゼ非依存的RNase H活性が存在する(非特許文献2参照)。

[0005] 現在認可されている逆転写酵素阻害剤である抗レトロウイルス薬は、全てポリメラーゼ活性部位又は非核酸系阻害剤結合部位に結合し、ポリメラーゼ活性を阻害する化合物である(非特許文献3参照)。すなわち、RNase H活性を阻害する化合物は新規作用機作の抗ウイルス薬となる可能性があり、逆転写酵素のポリメラーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤の全ての耐性ウイルスに対して効力を持つことが期待される。現在までに、HIV逆転写酵素のポリメラーゼ活性を阻害すること無くRNase H活性を特異的に阻害する化合物として、4-[5-(ベンゾイルアミノ)チエン-2-イル]-2,4-ジオキソブタン酸(非特許文献4参照)が報告されているが、この化合物は感染系アッセイにおいてはウイルス増殖を阻害することが出来ない。その他、マブシン類縁体の中にRNase H活性を阻害し、かつ、感染系アッセイにおいてもウイルス増殖を阻害することが出来る化合物が存在することが報告されている(特許文献1参照)。

[0006] RNase H活性を阻害する逆転写酵素阻害剤をスクリーニングするためにはRNase H活性を測定する必要がある。これまで報告のあるRNase H活性測定法は、テンプレートとしてRNAを、プライマーとしてDNAを用い、両者をハイブリダイズすることによりRNA:DNAヘテロ二重鎖を作製し、金属イオン存在下で酵素の基質とするものであった(非特許文献5参照)。この方法をスクリーニング方法として応用し、基質、金属イオン及び被検物質に逆転写酵素を加えて酵素反応を開始させるアッセイ系が使用されている(特許文献1参照)が、この条件下では、逆転写酵素-基質複合体(テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質と逆転写酵素の複合体)が形成されるとすぐ、逆転写酵素のRNase H活性によりテンプレートが切断される。テンプレートが切断されると酵素が基質から離れ、ターンオーバーして別の基質と結合する。そのため、逆転写酵素阻害剤の候補物質として見出された被検物質の作用点について複数の可能性が考えられ、区別するためには更なる実験が必要となる。また、テンプレートが切断されるRNaseH反応は非常に速やかであるため、被検物質が逆転写酵素-基質複合体に対して結合することでRNase H活性を阻害する働きを持っている場合、逆

転写酵素-基質複合体に対して結合する時間が十分に無い。さらに、逆転写酵素-基質複合体形成反応は酵素反応より時間がかかることから、RNase H阻害物質よりも逆転写酵素-基質複合体形成阻害物質の方が見出される可能性が高く、RNase H阻害剤のスクリーニング方法としては非常に効率が悪い。

[0007] これらの欠点を補うために、RNase H活性の発現に必須の金属イオン非存在下で逆転写酵素、基質及び被検物質をプレインキュベーションした後、金属イオンを加えて酵素反応を開始させるアッセイ系が考えられた(非特許文献4及び非特許文献6参照)。しかし、このアッセイ系では、逆転写酵素-基質複合体を形成する際に金属イオンが存在しない状態であり、本来宿主細胞内で形成される複合体が形成されていない状態で化合物とプレインキュベーションを行っていることになる。そのため、このアッセイ系で得られる化合物は宿主細胞内では機能しない可能性がある。

[0008] 逆転写酵素のRNase H活性についてはまだ不明な点も多く、宿主細胞内での逆転写反応をin vitroで再現することにより、その反応機構を解明しようという研究がされている。その中には、テンプレートとしてRNAとDNAのキメラ核酸、プライマーとしてDNAを使用し、宿主細胞内での逆転写反応をin vitroで再現した文献がある(非特許文献7参照)。なお、本文献では、テンプレート及びプライマーの配列はウイルスが持つ配列であり、プレインキュベーションの概念が開示されておらず、薬剤のスクリーニング等を示唆していない。

特許文献1: 国際公開第03/103610号パンフレット

非特許文献1: C. Palaniappanら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、272巻、11157-11164頁(1997)

非特許文献2: Arts, E. J.ら、プログレス イン ヌクレイック アシッド リサーチ アンド モレキュラー バイオロジー (Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.)、第58巻、339-393頁(1998)

非特許文献3: Parniak, M. A.ら、アドバンスド ファーマコロジー(Adv. Pharmacol.)、第49巻、67-109頁(2000)

非特許文献4: C. A. Shaw-Reidら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (J. Biol. Chem.)、278巻、2777-2780頁(2003)

非特許文献5:P. Rychetskyら、アナリティカル バイオケミストリー(Anal. Biochem.)、第239巻、113–115頁(1996)

非特許文献6:C. Palaniappanら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.)、270巻、4861–4869頁(1995)

非特許文献7:M. J. Rothら、ジャーナル オブ ビロロジー(J. Virol.)、74巻、9668–9679頁(2000)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、上記従来法の欠点を克服したRNase H阻害剤のスクリーニング方法を提供することを目的とする。具体的には、本来宿主細胞内で形成される機能的逆転写酵素-基質複合体に対して作用する阻害剤の検出感度を向上させた新しいRNase H阻害剤のスクリーニング方法を提供する。本発明は、かかるスクリーニング方法により、簡便かつ迅速にRNase H阻害剤をスクリーニングすることも1つの目的とする。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明者は、鋭意研究の結果、本来宿主細胞内で形成される金属イオンが結合した逆転写酵素-基質複合体と被検物質をプレインキュベーションする必要性を考慮し、適切なテンプレートとプライマーを用いることにより、DNA合成反応(ポリメラーゼ反応)及びRNaseH反応を起こさずに金属イオン存在下で逆転写酵素-基質複合体を形成させ、該複合体に対して被検物質をプレインキュベーションすることを可能とし、RNase H阻害剤のスクリーニング方法の検出感度向上に成功した。
- [0011] 以下に本発明において使用される基質について記載する。
- [0012] 本発明においては、逆転写酵素-基質複合体を形成する際に、該逆転写酵素のRNase H活性部位に該当する位置にRNA:RNA又はDNA:DNAのホモ二重鎖を持つような基質を使用する必要がある。例えば、二重鎖の部分が全てホモ二重鎖である基質を用いる。該基質を用いることにより、RNase H反応の開始を抑え、金属イオン存在下における被検物質及び逆転写酵素-基質複合体のプレインキュベーションが可能になった。
- [0013] また、dNTPsの添加によりポリメラーゼ反応が進行し、逆転写酵素がテンプレートの5

’末端まで進む。従って、本発明においては、逆転写酵素がテンプレートの5’末端まで進んだ際に、RNase H活性部位にテンプレートのRNA及びポリメラーゼ反応によって合成されたDNAのヘテロ二重鎖が位置するようなテンプレートを使用する必要がある。

[0014] 該テンプレートを用いることにより、被検物質とのプレインキュベーション後、dNTPsを添加するとポリメラーゼ反応が起こり、逆転写酵素が移動し、RNase H活性部位がRNA:DNAのヘテロ二重鎖部分に移動することにより、テンプレートが切断され、切断された核酸量を測定することによってRNase H活性阻害作用を検出することができる。

[0015] 上記基質を使用することにより、ポリメラーゼ活性を阻害すること無くRNase H活性を特異的に阻害する化合物をスクリーニングすることが可能になる。

[0016] また、RNaseHドメインに結合することでRNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する化合物も、新規作用機作の逆転写酵素阻害剤であり、本明細書内でRNase H阻害剤と記載する。しかし、RNase H阻害活性とポリメラーゼ阻害活性が同等に現れるので、現在公知の作用機作による逆転写酵素阻害剤(ポリメラーゼ活性部位又は非核酸系阻害剤結合部位に結合してポリメラーゼ活性を阻害する化合物)と測定結果がほぼ同じになる。このようなメカニズムのRNase H阻害剤については、RNase H活性部位に変異を導入した酵素等を用いた実験を行うことで作用機作を同定することが可能となる。つまり、RNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する被検物質については、既知のポリメラーゼ活性部位近傍に変異の入った逆転写酵素、例えばY188L変異酵素等、又は既知のRNase H活性部位近傍に変異の入った逆転写酵素、例えばY501W変異酵素等を使用することによって、該被検物質がポリメラーゼ活性部位あるいはRNase H活性部位に結合してその機能を調節しているか否かを検出することも可能である。つまり、野生型の逆転写酵素を使用した場合に阻害活性を示すが、上記変異酵素を使用した場合に阻害活性を示さない被検物質は、該変異酵素の変異箇所を持った部位に結合して逆転写酵素の機能を調節する。

[0017] その他、金属イオンは逆転写酵素の活性に必須の因子であり、RNase H活性部位とポリメラーゼ活性部位に結合することが知られている。このことから、既知のポリメ

ース活性部位に変異の入った逆転写酵素、例えばD185N変異酵素等、又は既知のRNase H活性部位に変異の入った逆転写酵素、例えばD443N変異酵素等を使用することによって、被検物質がポリメラーゼ活性部位又はRNase H活性部位に金属イオンを介して直接的に結合してその機能を調節しているか否かを検出することも可能である。つまり、野生型の逆転写酵素を使用した場合に阻害活性を示すが、上記変異酵素を使用した場合に阻害活性を示さない被検物質は、該変異酵素の変異箇所を持った部位に金属イオンを介して直接的に結合して逆転写酵素の機能を調節する。

[0018] すなわち、本発明は、

- (1) (a) テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質、金属イオン及び逆転写酵素をインキュベーションして複合体を形成する工程、
- (b) 工程(a)の後に被検物質を添加し、インキュベーションする工程及び、
- (c) 工程(b)の後にdNTPsを添加し、DNA合成反応を開始させる工程を含み、
該テンプレートが、5'-NRWXZ-3'であり、該プライマーが3'-Y-5' (YはテンプレートのXにハイブリダイズする) であるか、
該テンプレートが、5'-NRWX-3'であり、該プライマーが3'-YZ-5' (YはテンプレートのXにハイブリダイズする) であるか、又は、
該基質が、5'-NRWXZY-3' (YはXにハイブリダイズする) である、
ここで、
Nは13〜19merのDNA、RNA又はキメラ核酸、
RはRNA、
WはDNA又はキメラ核酸、
Xは15mer以上のDNA、RNA又はキメラ核酸、
YはハイブリダイズするXと同じ長さのDNA、RNA又はキメラ核酸であり、ハイブリダイズするXがDNAの場合はDNA、ハイブリダイズするXがRNAの場合はRNA、ハイブリダイズするXがキメラ核酸の場合はキメラ核酸(キメラ核酸中、ハイブリダイズするXがDNAの場合はDNA、ハイブリダイズするXがRNAの場合はRNAである)、
ZはDNA、RNA又はキメラ核酸
(但し、WとZは無くてもよい) である、

逆転写酵素のRNase H阻害剤のスクリーニング方法、

(2) NがRNA、Wが無く、XがRNA、YがRNAである、(1)記載のスクリーニング方法、

(3) NがRNA、Wが無く、XがDNA、YがDNAである、(1)記載のスクリーニング方法、

(4) Xが18mer以上のDNA、RNA又はキメラ核酸である、(1)〜(3)いずれかに記載のスクリーニング方法、

(5) 該金属イオンが Mg^{2+} 又は Mn^{2+} である(1)〜(3)いずれかに記載のスクリーニング方法、

(6) 工程(c)で、逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体の形成阻害剤をdNTPsと共に添加する(1)記載のスクリーニング方法、

(7) 該形成阻害剤がヘパリンである、(6)記載のスクリーニング方法、

(8) 工程(c)の後に、

(d) テンプレートから切断された核酸量を測定する工程及び、

(e) 該測定値を被検物質非存在下での測定値と比較する工程を含む、(1)記載のスクリーニング方法、

(9) テンプレートが、5'末端又は3'末端が標識されたものである、(8)記載のスクリーニング方法、

(10) 該逆転写酵素がウイルスの逆転写酵素である、(1)記載のスクリーニング方法、

(11) 該ウイルスがHIVである(10)記載のスクリーニング方法、

(12) 該逆転写酵素がY188L耐性変異酵素である、(10)記載のスクリーニング方法、に関する。

発明の効果

[0019] 本発明のスクリーニング方法により、逆転写酵素のRNase H阻害剤を簡便、かつ迅速にスクリーニングすることができる。また、このスクリーニング方法により、逆転写酵素のポリメラーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤の耐性ウイルスに対して効力を持つ抗ウイルス薬の候補化合物をスクリーニングすることができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]キメラ基質の構造

[図2]HIV Y188L耐性変異酵素を用いた場合の化合物1のRNase H阻害率とポリメ
ース阻害率

[図3]HIV Y188L耐性変異酵素を用いた場合の化合物1の濃度-阻害率曲線

発明を実施するための最良の形態

- [0021] 本発明のスクリーニング方法である「逆転写酵素のH型RNA分解酵素阻害剤のスクリーニング方法」は、従来法と比較して、より簡易で効率的なスクリーニングを行うために、酵素反応を開始させる前に、金属イオン存在下でテンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質及び逆転写酵素の複合体と被検物質をプレインキュベーションすることを特徴とする。
- [0022] 「逆転写酵素」とは二重鎖の核酸と結合し、RNA及びDNAをテンプレートとして、相補的なDNAを合成するポリメラーゼ活性とRNA:DNAヘテロ二重鎖のRNA部分のみを分解するRNase H活性を持つ酵素を意味する。逆転写酵素はDNAポリメラーゼと同様、その反応開始にRNA又はDNAプライマーを必要とする。DNAポリメラーゼと異なる点はRNAをテンプレートとして用いることができる点である。
- [0023] 「逆転写酵素」としては、特に、ウイルスの逆転写酵素が好ましい。逆転写酵素を有するウイルスとしては、レトロウイルス科に属するウイルスが挙げられる。レトロウイルス科にはレンチウイルス亜科、オンコウイルス亜科、スプーマウイルス亜科等が知られており、レンチウイルス亜科に属するウイルスとしては、ヒト免疫不全ウイルス(HIV; Human immunodeficiency virus)、オンコウイルス亜科に属するウイルスとしては、肉腫ウイルス(Sarcoma virus)、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV; Human T-lymphotropic virus)、乳癌ウイルス(Mammary tumor virus)等が挙げられる。特に、HIVが好ましい。
- [0024] 「RNase H阻害剤」とはポリメラーゼ活性を阻害すること無くRNase H活性を特異的に阻害する化合物、又はRNase Hドメインに結合することでRNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する、という新規作用機作により阻害する化合物のことを意味する。
- [0025] 「核酸」とは塩基と糖とが共有結合した化合物であるヌクレオシドの糖分子にリン酸基がエステル結合した化合物であるヌクレオチドを構成単位とした高分子物質である

。

「DNA」とは、糖部分がデオキシリボースであり、かつ、アデニン、グアニン、シトシン、チミンからなる群より選ばれた塩基を含むヌクレオチドから構成される核酸である。本明細書においては、上記ヌクレオチドから構成される1mer以上である核酸をDNAと呼ぶ。

「RNA」とは、糖部分がリボースであり、かつ、アデニン、グアニン、シトシン、ウラシルからなる群より選ばれた塩基を含むヌクレオチドから構成される核酸である。本明細書においては、上記ヌクレオチドから構成される1mer以上である核酸をRNAと呼ぶ。

「キメラ核酸」とはDNAを構成するヌクレオチド及びRNAを構成するヌクレオチドから構成される2mer以上の核酸を意味する。

[0026] 「テンプレート」とは、一本鎖の核酸を意味し、DNA、RNA又はキメラ核酸から構成される。「プライマー」とは、上記テンプレートの一部に相補的な配列を持ち、テンプレートにハイブリダイズする核酸を意味し、DNA、RNA又はキメラ核酸から構成され、その3'末端がDNA合成に使われる。「テンプレート」と「プライマー」のハイブリダイズは当該分野で公知の方法により行われ得る。

[0027] 本発明に適した「テンプレート」としては、RNA又はキメラ核酸が挙げられる。本発明に適した「プライマー」としては、テンプレートにハイブリダイズする配列を持つDNA、RNA又はキメラ核酸が挙げられる。それぞれを以下の式で表すことが可能である。

テンプレート: 5' -NRWXZ- 3'

プライマー : 3' -Y- 5'

(YはテンプレートのXにハイブリダイズし、

Nは13〜19merのDNA、RNA又はキメラ核酸、

RはRNA、

WはDNA又はキメラ核酸、

Xは15mer以上のDNA、RNA又はキメラ核酸、

YはハイブリダイズするXと同じ長さのDNA、RNA又はキメラ核酸であり、ハイブリダイズするXがDNAの場合はDNA、ハイブリダイズするXがRNAの場合はRNA、ハイブリダイズするXがキメラ核酸の場合はキメラ核酸(キメラ核酸中、ハイブリダイズするXが

DNAの場合はDNA、ハイブリダイズするXがRNAの場合はRNAである)、
ZはDNA、RNA又はキメラ核酸である。

(但し、WとZは無くてもよい)

[0028] 別の様態としては、以下の式で表すことも可能である。

テンプレート: 5'—NRWX—3'

プライマー : 3'—YZ—5'

(YはテンプレートのXにハイブリダイズし、
N、R、W、X、Y及びZは全て上記と同意義。)

[0029] 「N」は逆転写酵素のRNase H活性部位とポリメラーゼ活性部位の活性中心間の距離の長さから1ヌクレオチド短い長さを持つRNA、DNA及びキメラ核酸である。13〜19merの長さの核酸が好ましい。

[0030] 「R」は逆転写酵素のポリメラーゼ活性によりDNA合成がテンプレートの5'末端まで進み、続いてRNase H反応が起る際に切断される結合を含むRNAである。1mer以上の長さのRNAであればよい。

[0031] 「W」はDNA又はキメラ核酸のいずれでもよく、長さは限定されない。また、「W」は無くてもよい。

[0032] 「X」及び「Y」は相補的な配列を持ち、ハイブリダイズする際に対となるヌクレオチドの糖が同じであれば、RNA、DNA又はキメラ核酸のいずれでもよい。逆転写酵素が二重鎖の核酸に結合してRNA:DNAヘテロ核酸のRNAを切断するポリメラーゼ非依存的RNase H活性を持つことから、DNA合成反応開始前にこのRNase H活性によるテンプレートの加水分解を防ぐために、「Y」は、ハイブリダイズする「X」部分の核酸とRNA:RNA又はDNA:DNAのホモ二重鎖を形成するように相補的な配列を持つ核酸であることが好ましい。プライマーの長さが15merより短い場合DNA合成の効率が下がることから、効率良く本発明のスクリーニングを行うために、「X」及び「Y」はヌクレオチドが15以上、特に18以上重合した核酸が好ましい。また、プライマー(「Y」部分)は一般には15mer〜30merの長さが汎用されており、特に18mer〜25merの長さが好ましい。

[0033] 「Z」はRNA、DNA又はキメラ核酸のいずれでもよく、長さは限定されない。また、「Z」

は無くてもよい。

- [0034] 逆転写酵素は、テンプレートとプライマーがハイブリダイズした二重鎖のリン酸部分を認識して結合する。逆転写酵素のRNase H活性部位はRNA:DNAのヘテロ二重鎖のRNAを認識して切断する。上記の認識、結合、切断は共に配列非特異的である。そのため、テンプレート及びプライマーは、上記条件に合う核酸であれば特定の配列及び長さには限定されない。つまり、本明細書に記載する、N、R、W、X、Y、Zの要件を満たすものであれば、特定の配列及び長さには限定されない。
- [0035] テンプレート及びプライマーの長さは、酵素の種類によって適宜選択すればよく、例えば、29〜100mer(好ましくは、29〜50mer)の長さのテンプレート及び15〜50mer(好ましくは15〜30mer)のプライマーを使用することができる。
- [0036] 例えば、テンプレートが、RNAである時(例えば、5′-NRWXZ-3′において、NがRNA、Wが無し、XがRNA、ZがRNA又は無しの場合、又は、5′-NRWX-3′において、NがRNA、Wが無し、XがRNAの場合)、該RNAの長さが32mer以上、特に、該RNAの長さが37mer以上であるRNAが好ましい。
- テンプレートが5′-NRWXZ-3′であり、上記に示したようなRNAである時、プライマー(3′-Y-5′)は、テンプレートのRNA(X部分)にハイブリダイズする15mer以上、特に18mer以上のXと同じ長さのRNAであることが好ましい。
- テンプレートが5′-NRWX-3′であり、上記に示したようなRNAである時、プライマー(3′-YZ-5′)のY部分は、テンプレートのRNA(X部分)にハイブリダイズする15mer以上、特に18mer以上のXと同じ長さのRNAであることが好ましい。
- [0037] また別の態様としては、以下のものが挙げられる。例えば、テンプレートが、5′末端側にRNA、3′末端側にDNAを持つキメラ核酸である時(例えば、5′-NRWXZ-3′において、NがRNA、WがDNA又は無し、XがDNA、ZがDNA又は無しの場合、又は、5′-NRWX-3′において、NがRNA、Wが無く、XがDNAの場合)、該RNAの長さが17mer以上、該DNAの長さが15mer以上、特に、該RNAの長さが19mer以上、該DNAの長さが18mer以上であるキメラ核酸が好ましい。
- テンプレートが5′-NRWXZ-3′であり、上記に示したような5′末端側にRNA、3′末端側にDNAを持つキメラ核酸である時、プライマー(3′-Y-5′)は、テンプレート

のDNA(X部分)にハイブリダイズする15mer以上、特に18mer以上のXと同じ長さのDNAであることが好ましい。

テンプレートが5'-NRWX-3'であり、上記に示したような5'末端側にRNA、3'末端側にDNAを持つキメラ核酸である時、プライマー(3'-YZ-5')のY部分は、テンプレートのDNA(X部分)にハイブリダイズする15mer以上、特に18mer以上のXと同じ長さのDNAであることが好ましい。

[0038] 特に、テンプレートが上記に示したような5'末端側にRNA、3'末端側にDNAを持つキメラ核酸である時、19-25merのRNAを持ち、RNAの3'末端側に18-25merのDNAを持つキメラ核酸であるテンプレート及び18-25merのプライマー(DNA)の組み合わせが特に好ましい。

[0039] また、基質として1本鎖の核酸を使用することもできる。例えば、上記「テンプレート」の3'末端と上記「プライマー」の5'末端はリン酸ジエステル結合により結合して一本鎖となってもよい。このような基質は次のような式で表すことができる。

基質: 5'-NRWXZY-3'

(N、R、W、X、Z、Yは全て上記と同意義。)

[0040] 「金属イオン」としては、2価金属イオンが好ましく、例えば、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Co^{2+} 等が挙げられる。特に、 Mg^{2+} 及び Mn^{2+} が好ましい。

[0041] 「被検物質」とは、スクリーニングに使用される物質を意味し、化合物又はその塩が挙げられる。なお、本明細書においては、前記化合物又はその塩は、低分子化合物、高分子化合物、ポリペプチド又はその誘導体等を含む。かかる被検物質は、天然物質であってもよく、非天然物質であってもよい。ポリペプチドの誘導体としては、修飾基を付加して得られた修飾ポリペプチド、アミノ酸残基を改変することにより得られたバリエーションポリペプチド等が挙げられる。

[0042] 「dNTPs」とは、デオキシヌクレオチド三リン酸を意味し、DNA合成に使用される基質、デオキシアデニル三リン酸(dATP)、デオキシグアノシン三リン酸(dGTP)、デオキシシチジン三リン酸(dCTP)、デオキシチミジン三リン酸(dTTP)から構成されている。dNTPsは、本発明に用いる基質に応じて選択することができる。例えば、テンプレート(5'-NRWXZ-3'や5'-NRWX-3')のNRW部分に使用されている核酸に相補

的なdNTPsを用いればよい。テンプレートのNRW部分が任意の塩基配列からなるDNA、RNA又はキメラ核酸である場合、「dNTPs」としては、dATP、dGTP、dCTP、dTTPの混合物を用いればよい。NRW部分のヌクレオチドの糖が限られた種類であるテンプレートであれば、糖に相補的なdNTPsのみを用いればよい。

- [0043] 「逆転写酵素のRNase H阻害剤」とは逆転写酵素のRNase H酵素反応を阻害する物質を意味する。指標としては、一般的には、酵素活性を50%阻害することができる薬剤濃度(IC_{50} 値)が使用される。該阻害剤としては、 IC_{50} 値が $100\ \mu\text{M}$ 以下、特に、 $10\ \mu\text{M}$ 以下、さらには、 $1\ \mu\text{M}$ 以下の物質が好ましい。
- [0044] 「逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体の形成阻害剤」とは逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体形成を阻害する化合物である。本発明においては、工程(b)において基質と結合していない逆転写酵素が工程(c)において基質と結合し、酵素活性を発現することを回避すること、あるいは工程(c)においてdNTPsを入れて酵素反応を開始させた後に逆転写酵素がターンオーバーすることにより、再度基質と複合体を形成してRNase H反応が起る、という事態を回避することを目的として使用される。
- [0045] 該形成阻害剤としては、逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体形成を阻害する性質を持つ化合物であれば、特に限定することなく使用することができ、例えば、ヘパリン、二本鎖核酸等を用いることができる。
- [0046] 現在、逆転写酵素の阻害剤としてNevirapine等の非核酸系逆転写酵素阻害剤もスクリーニングされており、これらの化合物はHIVの逆転写酵素の非核酸系逆転写酵素阻害剤結合部位に結合することが知られている。また、現在知られている大半の非核酸系逆転写酵素阻害剤はY188Lの変異によって耐性を獲得することが知られている。
- [0047] 本発明のスクリーニング方法において、HIV 野生型逆転写酵素を用いた場合、RNaseHドメインに結合することでRNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する被検物質は、RNase H阻害活性とポリメラーゼ阻害活性が同等に現れるので、非核酸系逆転写酵素阻害剤である被検物質と測定結果がほぼ同じになる。
- [0048] そこで、本発明で使用する逆転写酵素として、188番目のチロシンをロイシンに変

異させたY188L耐性変異酵素を使用すると、逆転写酵素のポリメラーゼ阻害活性を有し、Nevirapine等と交差耐性を持つような被検物質が逆転写酵素の働きを阻害する可能性を除外することができ、効率良くRNase H阻害剤をスクリーニングすることができる。

[0049] 本発明は、上記の適切なテンプレートとプライマーの選択により、金属イオン存在下で逆転写酵素-基質複合体と被検物質とのプレインキュベーションを可能にしたという特徴を持つスクリーニング方法に関するものであり、検出方法等は公知のものを利用することができるが、特に、莫大な数の化合物をアッセイするスクリーニング、特にハイスループットスクリーニング (HTS) において有用である。本発明を実施すれば、ノイズ(擬陽性)を減少させることができ、効果的にRNase H阻害剤を選択することができる。

[0050] 本発明のスクリーニング方法としては、具体的には、
(a) テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質、金属イオン及び逆転写酵素をインキュベーションして複合体を形成する工程、
(b) 工程 (a) の後に被検物質を添加し、インキュベーションする工程、
(c) 工程 (b) の後にdNTPsを添加し、DNA合成反応を開始させる工程、
(d) テンプレートから切断された核酸量を測定する工程及び、
(e) 該測定値を被検物質非存在下での測定値と比較する工程を含む、スクリーニング方法が挙げられる。

[0051] 前記工程 (a) のインキュベーションは、該逆転写酵素の本来の機能を妨げない溶液中において、テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質、金属イオン及び逆転写酵素とを混合し、適切な反応条件、例えば、適切な反応温度、反応時間の下、維持することによって行われ得る。

[0052] 前記「酵素の本来の機能を妨げない溶液」としては、例えば、MOPSバッファー、HEPESバッファー、Trisバッファー等が挙げられる。

[0053] また、前記「適切な反応条件」としては、特に限定されないが、例えば、MOPSバッファー、HEPESバッファー、Trisバッファー等の溶液中、pH6.0～10.0、好ましくは、pH7.0～8.0、さらに好ましくは、pH7.4で、4℃～50℃、好ましくは、25℃～37

℃、さらに好ましくは、25℃、1分～1時間、好ましくは5分～20分、さらに好ましくは、10分維持すること等が挙げられる。より具体的には、50 mM MOPS(pH7. 4)、10mM MgCl_2 、1mM DTT、2mM EDTA、34mM KCl、0. 48nM 基質中、前記条件下に維持することが挙げられる。

[0054] 前記工程 (b) のインキュベーションは、該複合体の本来の機能を妨げない溶液中において、前記複合体と被検物質とを混合し、適切な反応条件、例えば、反応温度、反応時間等の下、維持することにより行なわれうる。溶液及び反応条件については、前記 (a) のインキュベーション時と同様に行われ得る。工程 (b) の適切なインキュベーション時間は、被検物質化合物によって異なるため、特に限定はされないが、好ましくは5分以上、より好ましくは10分以上、更に好ましくは15分以上維持することが挙げられる。工程 (b) のインキュベーションが不十分であれば被検物質の阻害活性が見いだせないということが起こり得る。

[0055] 前記工程 (c) のDNA合成は、逆転写酵素-基質複合体の本来の機能を妨げない溶液中において、前記複合体と被検物質とを混合し、適切な反応条件、例えば、反応温度、反応時間等の下、維持することにより行なわれうる。溶液及び反応条件については、前記 (a) のインキュベーション時と同様に行われ得る。

[0056] 前記工程 (d) のテンプレートから切断された核酸量を測定する方法としては、特に限定されず、当該分野において、一般的に、酵素活性を測定するために、核酸量を測定する方法として知られている方法を使用することができる。例えば、前記テンプレートから切断される核酸部分をあらかじめ標識しておけばよい。慣用の蛍光色素、放射性物質、ジゴキシンゲン等で標識することができる。標識部位はテンプレートの5'末端又は3'末端が好ましい。テンプレートから切断された核酸量の検出は、慣用の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動等において、オートラジオグラフィーや蛍光物質による可視化、標識テンプレートに基づく検出等を行なうこと等により行なわれうる。具体的には、エライザ法、キャピラリー電気泳動法、蛍光エネルギー転移反応、時間分解蛍光法 (HTRF) 等が挙げられる。

[0057] 工程 (e) において、前記工程 (d) における結果と、被検物質非存在下での測定値とを比較することによって、RNase H活性阻害の有無を調べることができる。被検物質

非存在下においては、逆転写酵素は本来の働きを果たし、テンプレートの5'末端側の核酸が切断される。そのため、基質として使用したテンプレートより短い核酸の断片が検出される。前記工程(d)の短い核酸断片の測定値(核酸量)が、被検物質非存在下での測定値と比較して、同等あるいはそれ以上であれば、該被検物質はRNase H阻害剤として使用することはできない。一方、前記工程(d)の短い核酸断片の測定値(核酸量)が、被検物質非存在下での測定値と比較して、それ以下あるいは測定限界以下の値であれば、該被検物質はRNase H阻害剤となり得る。

- [0058] 但し、被検物質が、現在知られている逆転写酵素阻害剤のようにポリメラーゼ阻害作用を持つ場合も存在する。該被検物質がポリメラーゼ阻害作用を持つ場合、DNA合成反応が開始せず、酵素が移動しないことから、RNase H反応は起らない。そのため、前記工程(d)の短い核酸断片の測定値(核酸量)が、被検物質非存在下での測定値と比較してそれ以下あるいは測定限界以下の値となる。このことから、RNase H阻害剤を目的としてスクリーニングを行う場合、さらに被検物質が逆転写酵素のポリメラーゼ活性を阻害する物質か否かを調べる必要がある。
- [0059] 被検物質が逆転写酵素のポリメラーゼ活性を阻害するか否かを調べる方法としては、特に限定されず、当該分野において、公知のポリメラーゼ活性を測定するアッセイを使用することができる。例えば、ショウ・レイド(C. A. Shaw-Reid)ら、ザ ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.)、278巻、2777-2780頁(2003)に記載のRNA依存的DNAポリメラーゼ活性測定法等が挙げられる。
- [0060] また、本スクリーニング方法を利用して、被検物質が逆転写酵素のポリメラーゼ活性を阻害するか否かを調べることができる。例えば、工程(a)〜(c)まで行った後、プライマーの長さを測定することによって調べるることができる。被検物質非存在下においては、逆転写酵素は本来の働きを果たし、ポリメラーゼ活性によりプライマーが伸張する。そのため、基質として使用したプライマーより長い核酸が検出される。工程(a)の時点より長いプライマーの測定値(核酸量)が、被検物質非存在下での測定値と比較して、同等あるいはそれ以上であれば、該被検物質はポリメラーゼ活性を阻害しない。一方、工程(a)の時点より長いプライマーの測定値(核酸量)が、被検物質非存在下での測定値と比較して、それ以下あるいは測定限界以下の値であれば、該被検物質

はポリメラーゼ活性を阻害する。

- [0061] DNA合成により伸長したプライマー量を測定する方法としては、特に限定されず、当該分野において、一般的に、核酸量を測定する方法として知られている方法を使用することができる。例えば、前記プライマーをあらかじめ標識しておけばよい。慣用の蛍光色素、放射性物質、ジゴキシゲニン等で標識することができる。標識部位はプライマーの5'末端が好ましい。伸長したプライマーの検出は、慣用の変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動等において、オートラジオグラフィーや蛍光物質による可視化、標識プライマーに基づく検出等を行なうこと等により行なわれ得る。具体的には、エライザ法、キャピラリー電気泳動法、蛍光エネルギー転移反応、時間分解蛍光法(HTRF)等が挙げられる。
- [0062] しかし、上記方法でポリメラーゼ活性を阻害すると判断される被検物質の中に、RNaseHドメインに結合することでRNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する物質も存在する。このような被検物質の場合、プライマーの伸長阻害とテンプレートの切断阻害は同等に現れ、結果としてプライマーの長さは工程(a)の時点と変化しない。そのため、現在公知の作用機作による逆転写酵素阻害剤(ポリメラーゼ活性部位又は非核酸系阻害剤結合部位に結合してポリメラーゼ活性を阻害する化合物)と測定結果がほぼ同じになる。
- [0063] 上記のRNase H活性及びポリメラーゼ活性阻害の測定結果により、被検物質は表1に記載のように判断することが出来る。なお、結果は被検物質存在下での核酸の測定量を対照としている。
- [0064] [表1]

被検物質	工程 (d) の短い核酸断片の核酸量 (比対照)	伸張したプライマーの核酸量 (比対照)
RNase H 活性もポリメラーゼ活性も阻害しない物質	同等	同等
ポリメラーゼ活性を阻害することなく RNase H 活性を特異的に阻害する物質	減少	同等
既知作用機作でポリメラーゼ活性を阻害する物質	減少	減少
RNaseH ドメインに結合することで RNase H 活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する物質	減少	減少

[0065] 表1に記載のように、上記方法では、RNaseHドメインに結合することでRNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する物質と現在公知の作用機作による逆転写酵素阻害剤(ポリメラーゼ活性部位又は非核酸系阻害剤結合部位に結合してポリメラーゼ活性を阻害する化合物)を区別することが出来ない。このようなメカニズムのRNase H阻害剤については、RNase H 活性部位に変異を導入した酵素等を用いた実験を行うことで作用機作を同定することが可能となる。つまり、RNase H活性とポリメラーゼ活性を同時に阻害する被検物質については、既知のポリメラーゼ活性部位近傍に変異の入った逆転写酵素、例えばY188L変異酵素等、又は既知のRNase H活性部位近傍に変異の入った逆転写酵素、例えばY501W変異酵素等を使用した既知のRNase H活性測定法及び本発明のスクリーニング方法により、該被検物質がポリメラーゼ活性部位あるいはRNase H活性部位に結合してその機能を調節しているか否かを調べることも可能である。

[0066] また、金属イオンは逆転写酵素の活性に必須の因子であり、RNase H活性部位とポリメラーゼ活性部位に結合することが知られている。当該分野で既知のポリメラーゼ活性部位に変異の入った逆転写酵素、例えばD185N変異酵素等、又はRNase H活性部位に変異の入った逆転写酵素、例えばD443N変異酵素等を使用した既知のRNase H活性測定法及び本発明のスクリーニング方法により、被検物質がポリメラーゼ活性部位又はRNase H活性部位に金属イオンを介して直接的に結合してその機能を調節しているか否かを調べることも可能である。

[0067] 本発明のスクリーニング法により得られた化合物又はその塩は、RNase H活性を有

する逆転写酵素を持つ病原体(例えば、HIV等)により引き起こされる病気に対する治療又は予防作用を発揮し得る。したがって、前記スクリーニング方法により得られた化合物又はその塩により、RNase Hに関連する疾患、例えば、エイズ等の治療又は予防に用いるための医薬組成物が提供される。

[0068] 本発明のスクリーニング方法により得られた化合物又はその塩を有効成分として含有する医薬組成物は、前記RNase Hの機能に関連する疾患、該機能に関連して発症する疾患に対して、該RNase Hの機能の阻害を介して作用するという優れた効果を発揮する。また、該医薬組成物によれば、前記RNase Hの機能に関連して発症するエイズに対して、該機能の阻害を介して作用するという優れた効果を発揮する。したがって、該医薬組成物によれば、逆転写酵素のポリメラーゼ、インテグラーゼ及びプロテアーゼの活性を阻害することに基づく既存の抗ウイルス薬とは異なる作用機序によりウイルス性疾患を改善することができるという優れた効果を発揮する。

[0069] 上記の医薬組成物中における前記化合物又はその塩の含有量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができ、治療上有効量であればよく、低分子化合物又は高分子化合物の場合、例えば、0.0001〜1000mg、好ましくは、0.001〜100mg、ポリペプチド又はその誘導体の場合、例えば、0.0001〜1000mg、好ましくは、0.001〜100mgであることが望ましい。

[0070] 上記の医薬組成物は、前記化合物又はその塩を安定に保持しうる種々の助剤をさらに含有してもよい。具体的には、有効成分の送達対象となる部位に到達するまでの間に、有効成分が分解することを抑制する性質を呈する薬学的に許容されうる助剤、賦形剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、溶解補助剤、等張剤等が挙げられる。

[0071] 上記の医薬組成物の投与形態は、有効成分の種類;投与対象となる個体、器官、局所部位、組織;投与対象となる個体の年齢、体重等に応じて、適宜選択される。前記投与形態としては、皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射、局所投与等が挙げられる。

[0072] また、上記の医薬組成物の投与量も、有効成分の種類;投与対象となる個体、器官、局所部位、組織;投与対象となる個体の年齢、体重等に応じて、適宜選択される。投与としては、特に限定されないが、有効成分が、低分子化合物又は高分子化合物

である場合、前記有効成分の量として、例えば、0.0001～1000mg/kg体重、好ましくは、0.001～100mg/kg体重、ポリペプチド又はその誘導体の場合、例えば、0.0001～1000mg/kg体重、好ましくは、0.001～100mg/kg体重の1回投与量となるように、1日につき、複数回、例えば、1～3回投与すること等が挙げられる。

実施例 1

[0073] 基質の調製

プロリゴ社により合成されたRNA-DNAキメラ核酸、及びキアゲン社により合成されたDNAプライマーをハイブリダイズさせたものを基質(図1)として使用した。RNase H活性阻害作用を調べる際にはテンプレート側、ポリメラーゼ活性阻害作用を調べる際にはプライマー側の5'末端をそれぞれT4 polynucleotide kinaseと[γ -³²P]ATPを使って標識したものを使用する。標識した核酸は変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて精製後、等モルの未標識相補鎖と共にKTEバッファー液(組成:80mM KCl、1mM EDTA、10mM Tris-塩酸(pH 8.0))中で混合し、85℃で15分間加熱後、ゆるやかに温度を下げて相補鎖同士をハイブリダイズさせてから用いた。

実施例 2

[0074] 酵素反応

ポリプロピレン製のチューブに、酵素反応液(組成:50 mM MOPS (pH7.4)、10 mM MgCl₂、1 mM DTT、2 mM EDTA、34 mM KCl、0.48 nM 基質)を10.25 μ l分注した。次にHIVの逆転写酵素を含む酵素溶液(0.1 pmol 逆転写酵素)1 μ lを加え、良く混合した。室温で10分間インキュベート後、被検化合物のDMSO溶液1.25 μ l、ポジティブコントロール(PC)及びネガティブコントロール(NC)には、DMSO 1.25 μ lを加え、よく混合した。室温で15分間インキュベート後、反応開始液(組成:1 mg/mL ヘパリン、0.1 mM dNTPs)1 μ lを加え、室温で10分間インキュベートした後、反応停止液(組成:45% formamide、5 mM EDTA、0.05% bromo phenol blue、0.05% xylene cyanol) 12.5 μ lを加えた。NCについては反応開始液添加前に反応停止液12.5 μ lを加えることで予め反応を停止させた。なお、表記濃度は全て終濃度である。

実施例 3

[0075] 阻害率の測定

反応液を85 °Cで5分間加熱し、氷上で2分間急冷後、変性ポリアクリルアミドゲル(ゲル組成: 8M urea、20% acrylamide)にて電気泳動を行い、反応産物を分離した。BAStation ver.3.0(Fujifilm)にて反応産物のバンド強度を定量し、以下の計算式に従ってRNase H反応阻害率、ポリメラーゼ反応阻害率をそれぞれ求めた。被検化合物として、RNase H阻害剤(化合物1; 4-[5-(ベンゾイルアミノ)チエン-2-イル]-2,4-ジオキソブタン酸)、コントロール化合物として、逆転写酵素に非特異的に結合する Suramin sodium及び非核酸系逆転写酵素阻害剤であるNevirapineを使用した。

[0076] 図2に化合物1のオートラジオグラフィー図と下記数式1によって求まる阻害率を示す。図3に化合物1の濃度-阻害曲線を示す。表2にHIVの野生型逆転写酵素を使用した場合の IC_{50} 値を示す。 IC_{50} 値は下記数式2によって求まる。単位は μ g/mlである。表3にHIVのY188L耐性変異酵素を使用した場合の IC_{50} 値を示す。 IC_{50} 値は下記数式2によって求まる。単位は μ g/mlである。なお、表記濃度は全て終濃度である。

[0077] [数1]

$$\text{阻害率 (\%)} = 100[1 - \{(C \text{ density} - NC \text{ density}) / (PC \text{ density} - NC \text{ density})\}]$$

C density : 化合物を加えた場合の酵素反応物のバンド強度
 NC density : NC の酵素反応物のバンド強度
 PC density : PC の酵素反応物のバンド強度

[0078] [数2]

$$IC_{50} \text{ 値} = B - (Y - 50)(B - A) / (Y - X)$$

X ; 化合物濃度 A のときの阻害率
 Y ; 化合物濃度 B のときの阻害率
 A, B ; 阻害率 50%をはさむ 2 点の化合物濃度

[0079] [表2]

[0080] [表3]

No.	プレインキュベーションなし ^(a)			プレインキュベーションあり		
	RNaseH	Polymerase	RNaseH	Polymerase	RNaseH	Polymerase
化合物1	>100	>100	>100	>100	30	>100
suramin	>100	>100	≡POL	21	≡POL	3.2
nevirapine	≡POL	10	≡POL	0.18	≡POL	0.34

(a) プレインキュベーションなし; 金属コファクター存在下、形成された逆転写酵素-基質複合体に対して被検化合物のDMSO溶液と反応開始液を同時に添加する

(b) プレインキュベーションあり、金属コファクターなし; 金属コファクター非存在下で逆転写酵素-基質複合体を形成させ、被検化合物のDMSO溶液を加えてプレインキュベーションした後、金属コファクターと反応開始液を同時に添加する

No.	プレインキュベーションなし				プレインキュベーションあり			
	RNaseH	Polymerase	RNaseH	Polymerase	金属コファクターなし RNaseH	金属コファクターなし Polymerase	金属コファクターあり RNaseH	金属コファクターあり Polymerase
化合物1	>100	>100	>100	>100	>100	>100	24	>100
suramin	>100	>100	>100	>100	≠POL	13	≠POL	3.2
nevirapine	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100

数値はIC50 (μg/mL)

[0081] これらの結果から、化合物1は、ポリメラーゼ反応を阻害することなくRNase H活性を特異的に阻害するRNase H阻害剤であるが、その阻害活性を感度良く検出するためには、金属イオン存在下で構築される逆転写酵素－基質複合体に対してプレインキュベーションすることが肝要である。また野生型逆転写酵素の代わりに非核酸系逆転

写酵素阻害剤が耐性になるY188L耐性変異酵素を使用すると、Nevirapineのポリメラーゼ阻害活性は消失するがSuramin sodiumの阻害活性は野生型逆転写酵素を使用した場合とほぼ同等である。このことから、野生型逆転写酵素の代わりにY188L耐性変異酵素を使用することで、Nevirapine等と交差耐性を持つような被検物質が酵素の働きを阻害する可能性を除外することができるため、目的とするRNaseH阻害剤を効率よくスクリーニングすることができることがわかる。Suramin sodium は、ポリメラーゼ活性とRNase H活性を同時に阻害するものであるが、非核酸系逆転写酵素阻害剤である可能性は低く、一般に様々な酵素系で阻害活性が報告されており、非特異的蛋白結合物質である。

実施例 4

[0082] 蛍光エネルギー転移反応を利用した阻害率の測定

テンプレートの3'末端をジゴキシゲニンで標識し、アッセイプレートに固定する。テンプレートの5'末端は6-FAM等の蛍光物質で標識する。dNTPsの中に予め蛍光物質のクエンチャーであるTAMRA等で標識されたデオキシヌクレオチド三リン酸を加えておき、ポリメラーゼ反応終了時には蛍光物質近辺に、ポリメラーゼ反応により取り込まれたデオキシヌクレオチド-クエンチャーが存在し、蛍光物質から発せられる蛍光を消光させることができるようにテンプレート、プライマーの塩基配列を設計する。反応終了後、6-FAMの消光の度合いを測定することでポリメラーゼ阻害活性を測定することが可能である。次にRNase H活性によって切断されたテンプレート断片がアッセイプレートから解離するような洗浄条件で洗浄した後、プレートに残存する6-FAMによる蛍光を測定することでRNase H阻害活性を測定することが可能である。その結果、逆転写酵素のRNase H阻害剤の候補化合物をスクリーニングすることができる。

実施例 5

[0083] キャピラリー電気泳動法を用いた阻害率の測定

基質をRIで標識する代わりに2種類の蛍光物質を用いる。例えば5'末端を6-FAMで標識したキメラテンプレート、及び5'末端をPETTMで標識したプライマーをハイブリダイズさせたものを基質として使用する。反応後2.5 μ Lの90mM EDTA溶液を加えて反応を停止させ、反応液3 μ Lに対しGeneScan 120 LIZ Size StandardをHi Di

Formamideで60倍希釈した溶液10 μ Lを加え、85°Cで5分間加熱し、氷上で2分間急冷後ABI PRISM 3100にてキャピラリー電気泳動を行う。泳動結果はGeneMapper3.5で解析する。RNaseH活性は切断された6-FAM標識核酸のピーク量を、ポリメラーゼ活性は44merまで伸長したPETTM標識核酸のピーク量を定量することにより求める。その結果RNaseH阻害剤の候補化合物をスクリーニングすることが可能となる。

産業上の利用可能性

- [0084] 本発明のスクリーニング方法を使用することによりポリメラーゼ依存的RNase H活性を阻害する化合物を効率的にスクリーニングすることができる。スクリーニングされたRNase H阻害剤は新規作用機作の抗ウイルス薬であり、逆転写酵素のポリメラーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤及びプロテアーゼ阻害剤の耐性ウイルスに対して効力を持つ抗ウイルス薬を開発することができる。

請求の範囲

- [1] (a) テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質、金属イオン及び逆転写酵素をインキュベーションして複合体を形成する工程、
(b) 工程 (a) の後に被検物質を添加し、インキュベーションする工程及び、
(c) 工程 (b) の後にdNTPsを添加し、DNA合成反応を開始させる工程を含み、
該テンプレートが、5'-NRWXZ-3'であり、該プライマーが3'-Y-5' (YはテンプレートのXにハイブリダイズする) であるか、
該テンプレートが、5'-NRWX-3'であり、該プライマーが3'-YZ-5' (YはテンプレートのXにハイブリダイズする) であるか、又は、
該基質が、5'-NRWXZY-3' (YはXにハイブリダイズする) である、
ここで、
Nは13〜19merのDNA、RNA又はキメラ核酸、
RはRNA、
WはDNA又はキメラ核酸、
Xは15mer以上のDNA、RNA又はキメラ核酸、
YはハイブリダイズするXと同じ長さのDNA、RNA又はキメラ核酸であり、ハイブリダイズするXがDNAの場合はDNA、ハイブリダイズするXがRNAの場合はRNA、ハイブリダイズするXがキメラ核酸の場合はキメラ核酸 (キメラ核酸中、ハイブリダイズするXがDNAの場合はDNA、ハイブリダイズするXがRNAの場合はRNAである)、
ZはDNA、RNA又はキメラ核酸
(但し、WとZは無くてもよい) である、
逆転写酵素のRNase H阻害剤のスクリーニング方法。
- [2] NがRNA、Wが無く、XがRNA、YがRNAである、請求項1記載のスクリーニング方法。
- [3] NがRNA、Wが無く、XがDNA、YがDNAである、請求項1記載のスクリーニング方法。
- 。
- [4] Xが18mer以上のDNA、RNA又はキメラ核酸である、請求項1〜3いずれかに記載のスクリーニング方法。
- [5] 該金属イオンが Mg^{2+} 又は Mn^{2+} である請求項1〜3いずれかに記載のスクリーニング方

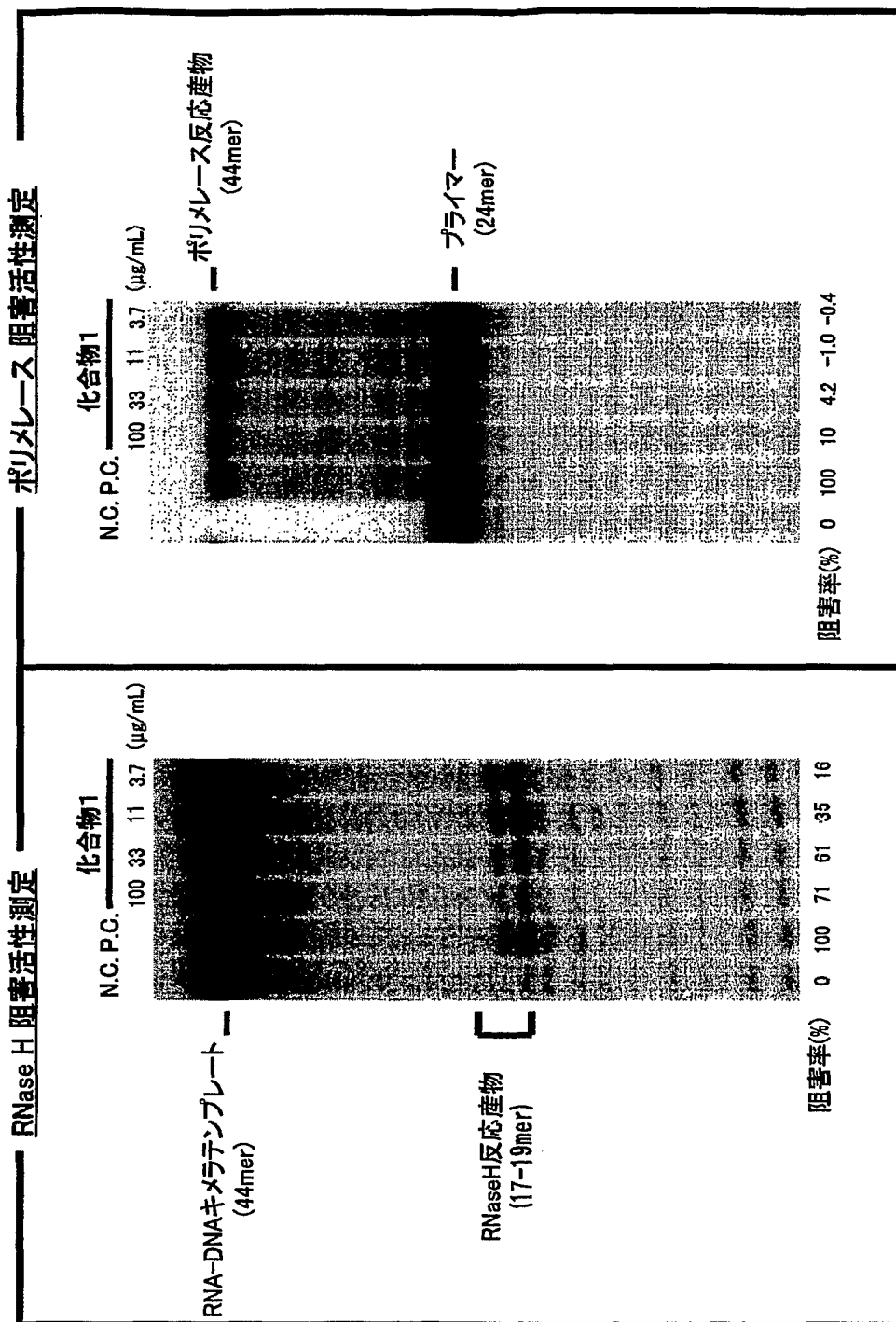
法。

- [6] 工程(c)で、逆転写酵素、基質及び金属イオンの複合体の形成阻害剤をdNTPsと共に添加する請求項1記載のスクリーニング方法。
 - [7] 該形成阻害剤がヘパリンである、請求項6記載のスクリーニング方法。
 - [8] 工程(c)の後に、
(d)テンプレートから切断された核酸量を測定する工程及び、
(e)該測定値を被検物質非存在下での測定値と比較する工程を含む、請求項1記載のスクリーニング方法。
 - [9] テンプレートが、5'末端又は3'末端が標識されたものである、請求項8記載のスクリーニング方法。
 - [10] 該逆転写酵素がウイルスの逆転写酵素である、請求項1記載のスクリーニング方法。
 - [11] 該ウイルスがHIVである請求項10記載のスクリーニング方法。
 - [12] 該逆転写酵素がY188L耐性変異酵素である、請求項10記載のスクリーニング方法。
- 。

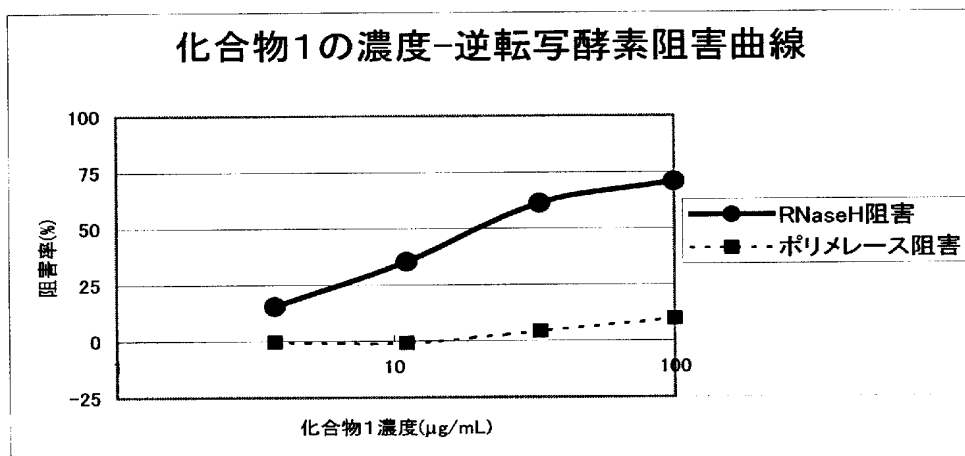
	R	W	X	
5' -	CAG UCC UCU AUU GUG UGC ATC AAA GGA TAG ATG TAA AAG ACA CC	-3'		
	3' -	G TTT CCT ATC TAC ATT TTC TGT GG	-5'	
		Y		

template 5'-NRWXZ-3': N=0, R=19, W=1, X=24, Z=0
primer 3'-Y-5': Y=24

[図2]



[図3]



$$\begin{aligned}
 \text{IC}_{50}\text{値} &= B - (Y - 50)(B - A) / (Y - X) \\
 &= 33.3 - (61.1 - 50)(33.3 - 11.1) / (61.1 - 35.3) \\
 &= 24
 \end{aligned}$$

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C12Q1/48, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C12Q1/48, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Parniak MA, et al., A fluorescence-based high-throughput screening assay for inhibitors of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity., Anal Biochem. (2003), Vol.322, No.1, pages 33 to 39	1-12
A	N.McLellan, et al., High-Throughput Method Research report Nonradioactive detection of retroviral associated RNaseH activity in a microplate-based, high-throughput format., BioTechniques (2002), Vol.33, No.2, pages 424 to 429	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 April, 2005 (26.04.05)

Date of mailing of the international search report

17 May, 2005 (17.05.05)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/003100

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shao X., et al., Colorimetric assays for evaluation of the mode of action of human immunodeficiency virus type 1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors., Antivir Chem Chemother. (1998), Vol.9, No.2, pages 167 to 176	1-12
A	Fan N. et al., Simultaneous mutations at Tyr-181 and Tyr-188 in HIV-1 reverse transcriptase prevents inhibition of RNA-dependent DNA polymerase activity by the bisheteroarylpiperazine (BHAP) U-90152s., FEBS Lett. (1995), Vol.370, Nos.1 to 2, pages 59 to 62	1-12

Claims 1 to 12 disclose inventions relating to a method of screening an RNase H inhibitor to a reverse transcriptase by using a substrate which is "a substrate comprising a template hybridized with a primer:

wherein the template is 5'-NRWXZ-3' and the primer is 3'-Y-5' (wherein Y is hybridizable with X in the template);

the template is 5'-NRWX-3' and the primer is 3'-YZ-5' (wherein Y is hybridizable with X in the template); or

the template is 5'-NRWXZY-3' (wherein Y is hybridizable with X in the template);

wherein N represents a 13- to 19-mer DNA, RNA or chimeric nucleic acid;

R represents an RNA;

W represents a DNA or a chimeric nucleic acid;

X represents a 15-mer or higher DNA, RNA or chimeric nucleic acid;

Y represents a DNA, an RNA or a chimeric nucleic acid having the same length as X to be hybridized therewith, provided that Y is a DNA in the case where X to be hybridized therewith is a DNA, Y is an RNA in the case where X to be hybridized therewith is an RNA, or Y is a chimeric nucleic acid in the case where X to be hybridized therewith is a chimeric nucleic acid (in the chimeric nucleic acid, Y is a DNA in the case where X is a DNA, or Y is an RNA in the case where X is an RNA); and

Z represents a DNA, an RNA or a chimeric nucleic acid, provided that W and Z may be nil". However, screening of an RNase H inhibitor was confirmed in practice exclusively on the following substrate shown in Fig. 1:

	R	W	X
5'-	cag ucc ucu auu gug ugc atc aaa gga tag atg taa aag aca cc-3'		
		3'-	g ttt cct atc tac att ttc tgt gg -5'
			Y

template 5'-NRWXZ-3' : N=0, R=19, W=1, X=1, X=24, Z=0
 primer 3'-y-5' : Y=24.

Concerning the test compounds,

use was exclusively made, as control compounds for RNase H inhibitor (compound 1; 4-[5-(benzoylamino)thien-2-yl]-2,4-dioxobutanoic acid), suramin sodium binding nonspecifically to a reverse transcriptase and Nevirapine which is a non-nucleic acid type reverse transcriptase inhibitor. Namely, sufficient statement for carrying out the screening of an RNase H inhibitor for the above substrate in every case is not provided. Thus, it does not appear that the constitution of the invention relating to the above substrate is sufficiently described in the description.

Such being the case, the search was made on the parts supported by the description and disclosed therein, i.e., mainly on EXAMPLES.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12Q1/48, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ C12Q1/48, C12N15/09, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Parniak MA, et. al., A fluorescence-based high-throughput screening assay for inhibitors of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity., Anal Biochem. (2003), Vol. 322, No. 1, p. 33-39	1-12
A	N. McLellan, et. al., High-Throughput Methods Research report Nonradioactive detection of retroviral associated RNaseH activity in a microplate-based, high-throughput format., BioTechniques (2002), Vol. 33, No. 2, p. 424-429	1-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.04.2005

国際調査報告の発送日

17.05.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高 美葉子

4N

9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Shao X, et.al., Colorimetric assays for evaluation of the mode of action of human immunodeficiency virus type 1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors., Antivir Chem Chemother. (1998), Vol. 9, No. 2, p. 167-176	1-12
A	Fan N, et.al., Simultaneous mutations at Tyr-181 and Tyr-188 in HIV-1 reverse transcriptase prevents inhibition of RNA-dependent DNA polymerase activity by the bisheteroarylpiperazine (BHAP) U-90152s., FEBS Lett. (1995), Vol. 370, No. 1-2, p. 59-62	1-12

請求の範囲 1-12 には、「テンプレートにプライマーをハイブリダイズさせた基質であり、
 該テンプレートが、5' -NRWXZ- 3' であり、該プライマーが 3' -Y- 5' (Y はテンプレートの X
 にハイブリダイズする) であるか、
 該テンプレートが、5' -NRWX- 3' であり、該プライマーが 3' -YZ- 5' (Y はテンプレートの X
 にハイブリダイズする) であるか、又は、
 該基質が、5' -NRWXZY- 3' (Y は X にハイブリダイズする) である、
 ここで、

N は 13-19mer の DNA、RNA 又はキメラ核酸、

R は RNA、

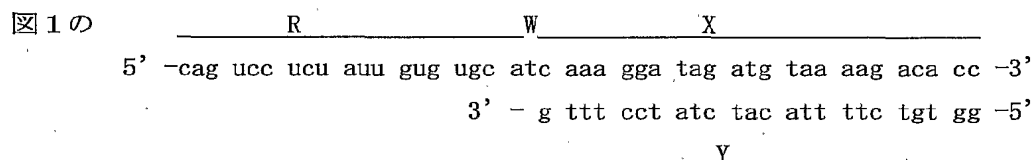
W は DNA 又はキメラ核酸、

X は 15mer 以上の DNA、RNA 又はキメラ核酸、

Y はハイブリダイズする X と同じ長さの DNA、RNA 又はキメラ核酸であり、ハイブリダイズする X が DNA
 の場合は DNA、ハイブリダイズする X が RNA の場合は RNA、ハイブリダイズする X がキメラ核酸の場合
 はキメラ核酸(キメラ核酸中、ハイブリダイズする X が DNA の場合は DNA、ハイブリダイズする X が RNA
 の場合は RNA である)、

Z は DNA、RNA 又はキメラ核酸

(但し、W と Z は無くてもよい) である」基質を用いる逆転写酵素の RNaseH 阻害剤のスクリーニング方法
 に係る発明が記載されているが、実際に RNaseH 阻害剤のスクリーニングを確認したのは、基質としては、



template 5' -NRWXZ-3' : N=0, R=19, W=1, X=1, X=24, Z=0

Primer 3' -Y-5' : Y=24

のみであり、

被検化合物としては、

RNase H 阻害剤 (化合物 1 ; 4-[5- (ベンゾイルアミノ) チエン-2-イル]-2,4-ジオキソブタン酸)

コントロール化合物として、逆転写酵素に非特異的に結合する Suramin sodium 及び非核酸系逆転写酵素
 阻害剤である Nevirapine を用いたのみであり、上記基質について、全ての場合における RNaseH 阻害剤
 のスクリーニングが行える程の十分な記載がないことから、上記基質に関する発明の構成が十分に明細書
 中に記載されているとは認められない。

したがって、調査は、明細書によって裏付けられ、開示されている部分、すなわち、実施例を中心にし
 て行った。